

ЛЕКЦІЯ №12

Азотфіксація, нітрифікація, денітрифікація

Історія азотфіксації

1883 – Жоден – показав накопичення азоту в ґрунті в живильних середовищах (без азоту) в замкнених ємкостях, де культивувалися мікроорганізми.

1885 – Бертло – підтвердив, що в стерильному ґрунті за літній період вміст азоту не змінився, а в нестерильному – збільшився.

1893 – Виноградський – виділив чисту культуру анаероба *Cl. pasteurianum*.

1901 – Беєрінк – відкрив аероба *Azotobacter chroococcus*.

Ще в першому столітті до нашої ери греки і римляни писали про підвищення урожаю бобовими рослинами (симбіоз з бактеріями). Перші роботи в цьому напрямі належать Буссенго Ж. (1838).

1886 – 1888 – Халльрігель і Вільфарт – довели взаємозв'язок між клубеньками на корінні бобах і фіксацією азоту.

1866 – Воронін М. С. – опублікував роботи про бактерій в тканинах клубеньків.

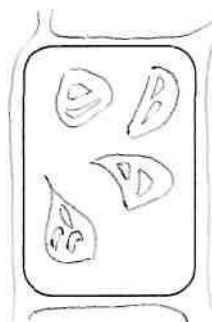
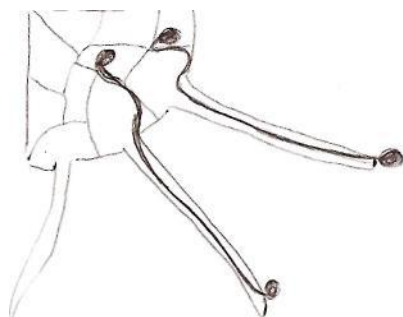
Фіксація азоту

Клубенькові бактерії в симбіозі з рослинами родини Бобові (*Fabaceae*) дають в рік 100 – 200 кг азоту на 1 га, вільноживучі – 1–3 кг/га. Всього на Землі за рік утворюється 175×10^6 т N_2 .

Клубенькові бактерії – рід *Rhizobium* – грамнегативні палички, сапрофіти у вільному стані ростуть за рахунок органічних сполук.

По специфічності відносно господаря-рослини, а також по деяких інших ознаках розрізняють декілька видів:

R. meliloti, *R. phaseoli*, *R. lupini*, *R. japonicum*.



бактероїди

Зараження рослин відбувається тільки через молоді кореневі волоски. Бактерії занурюються на самому кінці або біля кінця волоска і ростуть у вигляді інфекційної нитки до його основи. Потім такі нитки, одягнені целюлозною оболонкою, проникають крізь тонкі стінки молодого епідермісу в кору кореня.

Натрапивши тут на одну з тетраплоїдних клітин, нитка стимулює ділення її і сусідніх диплоїдних клітин. Так утворюється клубеньок. Стимулювання йде за рахунок ростових факторів.

Бактерії в бульбах розмножуються дуже швидко і утворюють крупні клітини неправильної форми – бактероїди, об'єм яких в 10–12 разів перевищує об'єм вільноживучих *Rhizobium*. Бактероїди розташовуються окремо або групами, оточені мембраною, в цитоплазмі рослинних клітин. Тканина, заповнена бактеріями, має червонувате забарвлення – містить пігмент леггемоглобін, споріднений гемоглобіну. Він полегшує дифузію кисню через клітину рослини до бактероїда. Утворення пігменту – це специфічний результат симбіозу: простетична група (активний центр) синтезується бактероїдом, а білковий компонент – за участю рослини. Білок, що в своєму складі містить Fe(II), має високу спорідненість до кисню. Леггемоглобін захищає клітини бактероїда від високого парціального тиску кисню.

В основі специфічності симбіозу *Rhizobium* з рослиною-господарем лежить перший контакт з волоском кореневої системи. Бобові рослини містять лектини – глікопротеїни, здатні специфічно зв'язуватися з полісахаридами на поверхні бактероїда. Можливо, саме взаємодія лектинів кореневого волоска з поверхневими полісахаридами *Rhizobium* визначає, чи буде волосок інфікований. Якщо рослина і *Rhizobium* сумісні, то рослина забезпечує сахарами бактерії, а вони віддають в цитоплазму азот у формі іонів амонію – близько 95%.

У деяких не бобових рослин теж є клубеньки, здатні фіксувати азот. В основному це симбіоз з актиноміцетами р. *Franckia* (100 – 300 кг/га в рік). Розмір клубеньків може досягати величини тенісної кульки.

Ціанобактерії: р. *Nostoc*, *Anabaena* – велику роль грають в культивуванні рису (утворюють гетероцисти і нітрогеназу).

Фіксація азоту вільноживучими мікроорганізмами

До 1949 р. здібність до фіксації молекулярного азоту розглядалася як властивість лише *Clostridium* і *Azotobacter*. Після початку застосування радіоізотопного методу (N^{15}), а також реакції відновлення ацетилену до етилену, з'ясувалося, що до вільноживучих азотфіксаторів можуть бути зараховані: *Bacillus polymyxa*, ціанобактерії, метилотрофні, сульфатредуючі, метаноутворюючі бактерії. Особливо ефективний *Azotobacter*: на 1 г цукру – 20 міліграм N_2 .

Azotobacter – грамнегативні, строгі аероби, окисляють багато органічних речовин, в певних умовах пересуваються за допомогою джгутиків. Виділяють багато слизу, мають темний пігмент – меланін. При недостатній кількості живильних речовин утворюють цисти з товстими стінками. Багато хто розвивається в ризосфері рослин. 30–50 кг азоту на 1 га в рік.

Представники:

- A. chroococcus* (чорний колір колоній)
- A. vinelandii*
- A. agilis* (безбарвні).

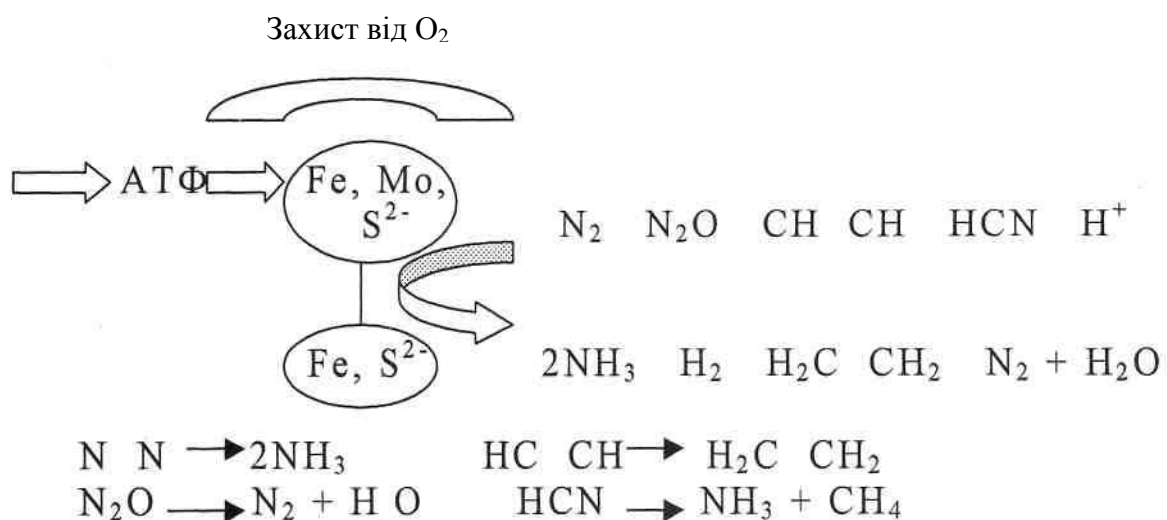
40 видів ціанобактерій: вони першими заселяють бідні (вулканічні) ґрунти. Живуть в екстремальних умовах існування: в Антарктиді, на півночі в симбіозі з грибами лишайників. У внутрішніх водоймищах і в деяких областях океану спостерігається розвиток ціанобактерій – «цвітіння води».

Коли в ґрунті є азот, то використовуються нітрати, нітрити, амінокислоти. Для фіксації молекулярного азоту необхідний Мо, Fe, Со. Мо входить до складу нітрогенази.

Нітрогеназа – фермент, що здійснює фіксацію азоту.

Зв'язування молекулярного азоту – це відновний процес, першим продуктом є аміак. Відновлення йде у ферментативному комплексі – нітрогеназа, яка складається з двох комплексів: Fe, Мо, S₂⁻ і білка з Fe, S₂⁻.

Фермент і процес дуже чутливі до молекулярного кисню, тобто нітрогеназа повинна бути захищена від дії O₂. Для зв'язування необхідна енергія, що йде від процесів – дихання, бродіння, фотосинтезу.



Оскільки утворюється H_2 , то завжди з нітрогеназою працює гідрогеназа, яка активує $H_2=NAD$.

Нітрифікація

Нітрифікація – явище окислення аміаку, що утворюється в ґрунті, гної, воді при розкладанні органічних речовин до азотистої, а потім азотної кислоти.

До середини 19 ст. рахували, що утворення нітратів в ґрунті – хімічний процес. Луї Пастер припустив, що це мікробіологічний процес.

1879 р. – Мюнцер і Шлезінг – пропускаючи стічну воду через колону з $CaCO_3$ і піском отримували NO_3 з NH_3 . Після стерилізації колони або дезінфекції цей процес порушувався.

Проте виявити чисту культуру нітрифікаторів не вдавалося і лише С. Н. Виноградський (1892) застосував особливу методику і виділив чисту культуру. Він припустив, що ці бактерії чутливі до органічних речовин і почав вирощувати на мінеральних середовищах – хемолітоавтотрофи. Виноградський встановив, що існує дві групи нітрифікаторів: одна веде процес до NH_4^+ , NO_2^- – перша фаза; друга фаза: азотиста в азотну NO_2^- , NO_3^- .

Бактерії обох груп відносять до родини *Nitrobacteriaceae*: грамнегативні палички, еліпсоїдні ($l = 0,3-6,5$ мкм), коки, звиті, плеоморфні, рухомі і нерухомі, джгутики полярні і перітрихи. Розмножуються діленням, окрім *Nitrobacter* – брунькуванням. Усередині є добре розвинена мережа мембран цитоплазми.

Бактерії першої фази:

- 1) *Nitrosomonas*
- 2) *Nitrosococcus*
- 3) *Nitrosolobus*
- 4) *Nitrospira*
- 5) *Nitrovibrio*.

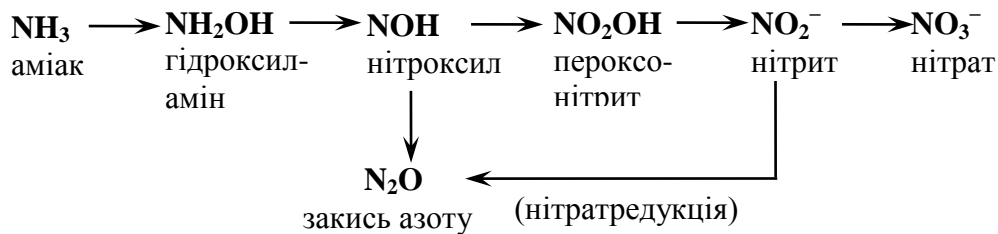
Єдиний детально вивчений представник – *Nitrosomonas europaea*. Проходить ряд стадій: спочатку овальні палички, потім нерухомі зооглеї. Бактерії другої фази:

- 1) *Nitrospira*
- 2) *Nitrobacter*
- 3) *Nitrococcus*.

Nitrobacter winogradskii – клиновидна, грушовидна форма, розмноження брунькуванням, спочатку рухомі форми, потім настає нерухома фаза. Аероби.

Середовища: NH_4^+ , NO_2 , CO_2 ;
рН 6–6,8 – 8,6; оптимальна рН 7,5;
оптимальна температура 25–30°C.

Передбачуваний шлях окислення аміаку:



Деякі гетеротрофні мікроорганізми здатні здійснювати нітрифікацію:

p. *Pseudomonas*

p. *Arthrobacter*

p. *Nocardia*

Утворення нітратів в ґрунті обідняє його. Метабіоз – поетапність трофічних зв'язків.

Денітрифікування

Відновлення нітратів і нітриту до газоподібних азотних з'єднань відбувається в результаті процесів прямого і непрямого денітрифікування.

Пряме денітрифікування – біологічне – розділяється на асиміляторну і дисиміляторну.

В процесі дисиміляторного денітрифікування нітрати використовуються як окислювач органічних речовин замість молекулярного кисню, що забезпечує мікроорганізмів необхідною енергією. Це нітратне дихання. Відновлення відбувається до молекулярного азоту.

При денітрифікуванні, що асимілює, нітрати відновлюються до аміаку, який служить джерелом азоту для побудови клітинних речовин. До цього денітрифікування здібні багато рослин і мікроорганізми.

Здатністю до дисиміляторного денітрифікування володіють ф-анаеробні бактерії, що живуть в основному в ґрунті та воді.

Мезофіли: *Paracoccus*

Pseudomonas denitrificans

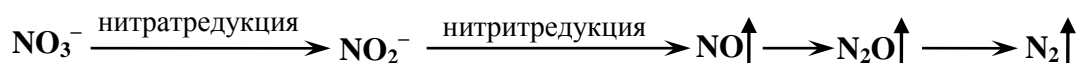
Ps. fluorescens

Ps. aeruginosa.

Є і термофіли – *Bacillus* (55 – 65°C).

Органіка окислюється при денітрифікуючому диханні до CO_2 і H_2O .

Залежно від мікроорганізмів, що здійснюють дисиміляторне денітрифікування, кінцевими продуктами можуть бути:



Асиміляторне денітрифікація:



В результаті денітрифікування ґрунт обідняється.

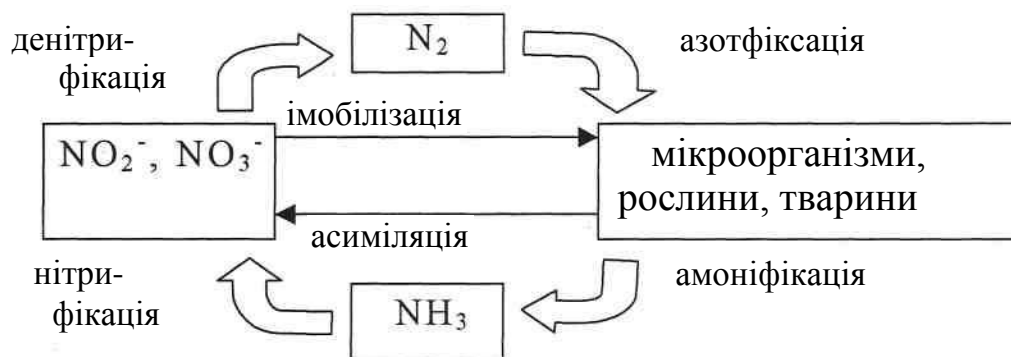
Кругообіг азоту

Кругообіг включає ряд взаємозв'язаних процесів: амоніфікацію, нітрифікацію, денітрифікацію, фіксацію молекулярного азоту.

Амоніфікація – процес мінералізації органічних речовин, що супроводжується виділенням аміаку.

Нітрифікація – окислення аміаку до нітриту і нітратів.

Денітрифікація – процес відновлення нітратів і нітритів до вільного азоту.



Переведення мінеральних форм азоту в білок мікроорганізмів – іммобілізація.